

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 歯学 )	氏名	大城 理紗子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当		
論文題目 Transcriptomic profiling of mouse vascular smooth muscle cells: Insights into calciprotein particle-induced calcification (マウス血管平滑筋細胞のトランスクリプトーム解析: カルシプロテイン粒子による石灰化への洞察)			
論文審査担当者			
主査	教授 吾郷 由希夫 印		
審査委員	教授 宿南 知佐		
審査委員	教授 太田 耕司		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>心血管疾患は慢性腎臓病 (CKD) の一般的な臨床合併症であり, 進行した CKD 患者の 50% が心血管疾患に罹患すると推定されている。CKD では, 腎機能障害により血中リン濃度が上昇し, さらに活性型ビタミン D の減少により血中カルシウム濃度が低下するため, 骨塩代謝が障害され, 骨粗鬆症などの腎性骨症が引き起こされる。それとは対照的に, 軟組織である血管では血管平滑筋細胞 (VSMCs) の異所性石灰化が引き起こされる。VSMCs の異所性石灰化は, 血中カルシウム・リン積の上昇により惹起されるが, このとき骨形成関連遺伝子の発現が誘導され, VSMCs は骨芽細胞様細胞へと分化する。最近の研究では, 循環コロイド凝集体であるカルシプロテイン粒子 (CPP) が CKD における血管石灰化の中心的な担い手であることが明らかにされつつある。この CPP は, カルシウムイオンおよびリン酸イオンからなるリン酸カルシウム結晶と肝臓由来の血中タンパク質であるフェッイン A で構成される。CPP は, モノマーが互いに凝集し一次カルシプロテイン粒子 (CPP I) を形成し, さらに二次カルシプロテイン粒子 (CPP II) に凝集する。CPP I は非結晶リン酸カルシウムを含む小さな球状のコロイドナノ粒子であるのに対し, CPP II はそのコアに結晶性リン酸カルシウムを含み, CPP I よりも大きく針状構造を有する。この CPP II は VSMCs の石灰化誘導能を有し, CKD 患者の血中で高値を示すことが知られているが, その病態的役割は不明である。そこで本研究では, CPP II による石灰化のメカニズム解明を目指し, マウス血管平滑筋細胞株である MOVAS 細胞を用いて, CPP II に対する反応性の異なるクローンを樹立するとともに, 網羅的遺伝子発現解析により石灰化に強く関連するシグナル経路の同定を目的とした。</p> <p>MOVAS 細胞親株の限界希釈によって得られた単一クローンを培養し, サブクローンを単離した結果, 34 個のサブクローンを得た。各サブクローンをプレートに播種後, 20 <math>\mu\text{g Ca/mL}</math> の CPP II と 1 mM の <math>\text{CaCl}_2</math> (CPP II +Ca) を培地に添加し, 石灰化誘導を行った。石灰化誘導 6 日後に, 細胞外基質中カルシウム含量を測定し, 各クローンの石灰化能を評価したところ, MOVAS 細胞は石灰化能の異なる細胞集団の混合物からなることが明らかになった。サブクローンのうち, クローン 28 (c28) とクローン 16 (c16) を, それぞれ高石灰化株と低石灰化株として選択した。いずれのクローンも, 石灰化誘導により平滑筋の分化マーカーである TAGLN (Transgelin) などの低下がみられ, 骨芽細胞分化マーカーである Osteopontin (SPP1) などの増加が認められた。さらにアリザリンレッド S 染色から, c28 では, c16 と比較して, 石灰化誘導により赤色に強く染色される箇所が多いことを確認した。</p> <p>つぎに, 石灰化誘導後の c28 と c16 における石灰化関連遺伝子の発現変化を解析するため, c28 と c16 を CPP II +Ca で処理し, 3 日間培養後に RNA を単離し RNA-シーケンシング (RNA-Seq) を行った。c28 と c16 について, それぞれ石</p>			

灰化誘導群とコントロール群の比較検討を行った。発現変動比で2倍より大きいまたは1/2未満、かつ False discovery rate が0.05未満の基準を満たすものを発現変動遺伝子 (DEGs) として抽出した。その結果、c28においてCPPⅡ+Caにより発現が変動した遺伝子は267個、c16においてCPPⅡ+Caにより発現が変動した遺伝子は310個あり、両者に共通する遺伝子として222個が同定された。DEGsの機能予測としてGOエンリッチメント解析を実施したところ、c28で発現が上昇した遺伝子群には、growth factor activity, chemoattractant activity, cytokine activity, chemokine activity, spectrin bindingなどのGOタームを有する遺伝子が濃縮されていた。一方、c16で発現が上昇した遺伝子群には、hydrolase activityのGOタームを有する遺伝子が濃縮されており、高石灰化株と低石灰化株とで違いがみられた。

つづいて、VSMCsの石灰化の違いにCPPⅡの取り込み能の変化が関与している可能性を検証するため、c28とc16に対しカルセイン標識したCPPⅡを処置し、その取り込み能を評価した。その結果、c28のCPPⅡ取り込み能は、c16よりも約17倍高いことが明らかになった。そこで、石灰化誘導を行っていないc28とc16のコントロール群のRNA-SeqデータについてDEGsの解析を行った。c28で発現が上昇していた1308遺伝子についてエンリッチメント解析を実施したところ、Cellular Componentのカテゴリーにおいて、cell junction, cytoplasm, basolateral plasma membrane, extracellular region, symbiont-containing vacuole membraneなどのGOタームを有する遺伝子が濃縮されていた。

以上、本研究では、MOVAS細胞においてCPPⅡ高反応性株と低反応性株を樹立し、そのトランスクリプトーム解析から、高反応性クローンでは石灰化誘導により増殖因子や遊走促進因子などが高発現していることを見いだした。さらに、高反応性クローンはCPPⅡ取り込み能が高く、石灰化を誘導する前の状態において、膜タンパクや細胞外基質に関連する分子の発現が高いことが示唆された。

以上の結果は、CPPⅡによるVSMC石灰化誘導のメカニズムを解明する端緒となる新知見であり、CKDに合併する血管異所性石灰化の治療戦略の構築につながるものと高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が大城理紗子に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。